

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS FÍSICOS
EN EL TRATAMIENTO DEL SEMEN FRESCO
DE ALPACA Y SU RELACIÓN CON LA
CALIDAD ESPERMÁTICA POST
CONGELACIÓN”**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Nathalie Zirena Arana

ASESOR

Wilfredo Huanca López

Lima – Perú

2014

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la vida, hacer bien mi historia y llevar a buen fin mis sendas y proyectos.

A mis padres, por su amor, apoyo incondicional, motivación y consejos.

A mis hermanas, por su apoyo, alegría y cariño.

A mi comunidad, por sus oraciones, por estar siempre presente y celebrar cada uno de mis logros.

A él, por sacarme muchas sonrisas y darme sus “si se puede” para seguir.

A mis amigas y amigos, por sus consejos y nobleza.

Al “Repro Team” (Jesús, Tito, Camilo, Martha, Marco, Fahrid), por todo el apoyo, amistad, consejos y los momentos de risas que hicieron dejar atrás el estrés y darme fuerza para continuar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Wilfredo Huanca López por toda la paciencia, consejos y asesoramiento para realizar este trabajo de tesis.

A la Dra. Ninoska Madrid de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia por su amistad, confianza, dedicación y enseñanzas a lo largo de la parte experimental de la tesis.

Al Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas por acogerme para realizar mis experimentos y brindarme los materiales necesarios.

A cada uno de mis amigos del laboratorio, en especial a Tito Limache de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, por su esfuerzo y tiempo, contribuyendo a la realización exitosa de este trabajo.

A mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por todos los conocimientos y experiencias adquiridas a lo largo de la carrera y que me serán útiles el resto de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|-------------------------------------------------------------|-------------|
| DEDICATORIAS | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | iv |
| RESUMEN EN ESPAÑOL | vii |
| ABSTRACT | viii |
| LISTA DE CUADROS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 Características reproductivas de la alpaca macho | 3 |
| 2.1.1 Anatomía del tracto reproductivo | 3 |
| 2.1.2 Pubertad | 5 |
| 2.1.3 Estacionalidad | 6 |
| 2.1.4 Comportamiento sexual, cópula y eyaculación | 7 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------|----|
| 2.2 | Colección de semen | 10 |
| 2.3 | Características del semen de alpaca | 12 |
| 2.3.1 | Características bioquímicas | 16 |
| 2.3.2 | Morfología espermática | 17 |
| 2.3.3 | Anormalidades del espermatozoide | 19 |
| 2.3.4 | Factores que afectan las características del semen | 20 |
| 2.4 | Criopreservación del semen | 21 |
| 2.4.1 | Licuefacción del semen | 22 |
| 2.4.2 | Dilutores de semen | 22 |
| 2.4.3 | Crioprotectores | 25 |
| 2.4.3.1 | Crioprotectores permeables | 25 |
| 2.4.3.2 | Crioprotectores no permeables | 27 |
| 2.4.4 | Métodos de criopreservación de semen | 27 |
| 2.4.5 | Proceso de criopreservación de semen | 28 |
| 2.4.6 | Factores críticos en el proceso de criopreservación | 30 |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 3.1 | Lugar de estudio | 32 |
| 3.2 | Descripción del material experimental | 32 |
| 3.3 | Preparación de materiales | 33 |
| 3.4 | Colección de semen | 33 |
| 3.5 | Evaluación y tratamiento del semen fresco | 33 |
| 3.6 | Refrigeración y congelación de semen | 35 |
| 3.7 | Descongelación de pajillas | 36 |
| 3.8 | Análisis estadístico | 36 |
| IV. | RESULTADOS | 37 |

| | | |
|--------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1 | Evaluación de semen fresco | 37 |
| 4.2 | Evaluación de la calidad espermática en refrigeración | 38 |
| 4.3 | Evaluación de la calidad espermática post-congelación | 39 |
| V. | DISCUSIÓN | 41 |
| VI. | CONCLUSIONES | 44 |
| VII. | RECOMENDACIONES | 45 |
| VIII. | LITERATURA CITADA | 46 |
| IX. | APÉNDICE | 60 |

RESUMEN

La inseminación artificial es una de las tecnologías que han contribuido al progreso genético en diversas especies domesticas de interés económico; sin embargo, la información sobre la colección, características, evaluación y conservación del semen en la alpaca sigue siendo insuficiente. Una de las principales limitantes es la gran viscosidad que presenta el eyaculado, por lo que se requiere evaluar métodos que contribuyan a la licuefacción del semen fresco, someterlo a un protocolo de criopreservación y relacionarlo con la calidad espermática post congelamiento. Para el presente estudio, se utilizó 4 alpacas machos adultos entrenados para la colección de semen por vagina artificial. Se realizó la colección una vez a la semana por 6 semanas hasta un total de 24 muestras. Cada muestra fue evaluada en fresco e inmediatamente se dividió en dos fracciones iguales y se les agregó un dilutor comercial. Cada fracción fue sometida a un esquema diferente en el tratamiento del semen: una fracción (A) fue sometida a la acción mecánica mediante pasajes por una aguja n° 18 y la otra fracción (B) fue sometida a agitación manual. Luego, ambas fracciones fueron centrifugadas a 802 g x 10 minutos. Cumplido el proceso, se retiró el sobrenadante y el pellet fue reconstituido con el dilutor comercial y se sometió a un descenso de la temperatura hasta 5°C y una reevaluación del semen. Posteriormente, se procedió a colocar el semen en pajuelas de 0.5 ml y fueron expuestas al vapor del nitrógeno líquido para luego ser almacenadas en el tanque. Después de 7 días de almacenamiento, las pajillas fueron descongeladas en agua a 37°C por un minuto y se realizaron las respectivas evaluaciones. En los resultados obtenidos post congelación, entre los tratamientos A y B con respecto al porcentaje de motilidad no se halló diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos (K-Wallis: 1.67; $p > 0.05$). En relación al porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides positivos al test de endosmosis (HOST) y al porcentaje de espermatozoides normales tampoco se encontró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANVA, $p > 0.05$).

Palabras clave: alpaca, criopreservación, jeringa, agitación, centrifugación

ABSTRACT

An important biotechnology with a great impact on the genetic improvement in domestic species is the develop of Artificial Insemination (AI). However, information on the collection, characteristics, evaluation and preservation of semen from the alpaca is still insufficient. The highly viscous nature of camelid semen represents a further challenge to the development of AI technology, which requires evaluation methods that contribute to liquefaction, submit to a cryopreservation protocol and study sperm quality post-thaw. For the present study, 4 male adult alpacas were trained for collection with artificial vagina. Semen collection was performed once a week for 6 weeks for a total of 24 samples. Each sample was assessed for quality parameters in fresh and immediately split into two equal fractions and were added a commercial dilutor. Each fraction was exposed to a different treatment of semen: a fraction (A) was submitted to the mechanical action by passages through a needle N°18 (needling) and the other fraction (B) was submitted to manual shaking. Then, both fractions were centrifuged at 802×10 minutes. Completed the process, the supernatant was removed and the pellet was reconstituted with commercial dilutor to be submitted to a temperature drop to 5 ° C and a reassessment of the semen. Then, 0.5 ml straws were loaded with the final dilution and they exposed to liquid nitrogen vapor before they were stored in the tank. After 7 days, the straws were thawed in water at 37°C for a minute to be tested. The results obtained after post-thawed between treatment A (needle passages) and B (hand shaking) for percent motility no statistically significant difference between the two treatments (K-Wallis: 1.67; $p > 0.05$) was found. In relation to the percentage of live sperm, percentage of sperm to test positive endosmosis (HOST) and the percentage of normal sperm was not statistically significant differences between treatments (ANOVA, $p > 0.05$).

Keywords: alpaca, cryopreservation, needling, shaking, centrifugation

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos de colección de semen de alpaca y las características del semen

Cuadro 2. Composición bioquímica del semen de alpacas

Cuadro 3. Características espermáticas de muestras de semen fresco obtenidas de cuatro alpacas machos adultas

Cuadro 4. Características espermáticas en refrigeración de muestras de semen sometidas a dos tratamientos físicos

Cuadro 5. Características espermáticas post congelación de muestras de semen sometidas a dos tratamientos físicos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vagina artificial modificada para la colección de semen de alpacas

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de los camélidos domésticos, alpacas y llamas, es una de las actividades de mayor importancia en el desarrollo socio económico de la población alto andina de nuestro país, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales sobre los 4000 msnm, sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal y medio de transporte y, en el caso de la alpaca, para la producción de fibra de buena calidad (Huanca, 2007).

Las biotecnologías reproductivas han contribuido al progreso genético de diferentes especies ganaderas como la bovina. Es por eso que el interés en la aplicación de estas tecnologías en los camélidos sudamericanos ha ido en aumento en los últimos años, ya que se está realizando una gran difusión de sus características productivas, tanto de las especies domésticas como las silvestres (Miragaya *et al.*, 2006). Incluso, las especies domésticas (llama y alpaca) se están criando como mascotas en hogares europeos. Sin embargo, aún no se ha podido establecer protocolos adecuados de las distintas biotecnologías reproductivas como inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro*, para los camélidos sudamericanos.

El desarrollo de la inseminación artificial (AI) sería muy valiosa en alpacas y llamas para contribuir en el avance genético para mejorar los rebaños (Novoa y Leyva, 1996); sin

embargo, esta pobremente desarrollada debido a la dificultad para coleccionar semen de buena calidad y por otro lado, la alta viscosidad propia del semen (Morton, 2006).

El primer paso en el manejo de semen es la eliminaci3n de la viscosidad (Garnica et al., 1993). Debido a esto, se han realizado diversas investigaciones como el uso de enzimas (Bravo et al., 1999) o m3todos mec3nicos como la aspiraci3n y expuls3n del eyaculado a trav3s de una aguja (Valdivia et al., 1999; Apaza *et al.*, 2001, B3rgamo *et al.*, 2012) o la centrifugaci3n (Tur3n *et al.*, 2013), con cierto 3xito para simplificar la manipulaci3n y permitir la diluci3n, extensi3n, y congelaci3n del semen. Por este motivo, el objetivo de esta investigaci3n fue comparar dos m3todos f3sicos, aspiraci3n por jeringa y agitaci3n manual, usados en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su efecto en la calidad esperm3tica post congelaci3n.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA ALPACA MACHO

2.1.1 Anatomía del tracto reproductivo

El sistema reproductivo de alpaca machos presenta varias características anatómicas y fisiológicas distintivas de otras especies (Tibary y Vaughan, 2006).

Prepucio

El prepucio tiene forma triangular, está aplanado de lado a lado, es no pendular y se sitúa en la línea media de la región inguinal (Fowler 1998), a 15 cm caudal al ombligo (Sumar, 2002), tiene músculos bien desarrollados (músculos prepuciales laterales y los músculos prepuciales craneal y caudal) que pueden dirigir el prepucio hacia delante para la erección y hacia atrás para orinar (Elwishy, 1988; Johnson, 1989).

Pene

En los camélidos sudamericanos, el pene se origina en la región del arco isquiático, y está compuesta por: raíz, cuerpo, porción libre y las glándulas peneanas (Tibary y Vaughan, 2006). El pene es fibroelástico, y su extremo tiene

forma de un gancho curvo, en dirección de las manecillas del reloj, con una pequeña proyección cartilaginosa de 1 cm de longitud que podría corresponder al “proceso uretral” (Sumar, 2002) este puede jugar un rol en la dirección del pene hacia la cérvix durante la cópula (Johnson, 1989; Bravo, 1995; Fowler, 1998), atravesando los anillos cervicales mediante movimientos rotacionales y de protrusión, y depositando el semen en el útero (Tibary y Vaughan, 2006). El tamaño del pene erecto en la alpaca es de 35 a 40 cm y la flexura sigmoidea es preescrotal (Sumar, 2002), y no se llega a expandir con la erección (Novoa y Leyva, 1996). Esta flexura sigmoidea permite la retracción del pene al prepucio cuando no hay erección (Bravo, 1995; Fowler, 1998).

Testículos

En la alpaca macho adulta, se observan los testículos en un escroto no pendular sin un cuello definido y formando una protuberancia subanal (Sumar, 2002). El tamaño de los testículos en esta especie son relativamente pequeños en comparación a otras especies (Bravo y Johnson, 1994; Tibary y Vaughan, 2006). Cada testículo mide entre 4 y 5 cm de longitud y 2.5 a 3.0 cm de grosor y pesa 15-18 g, siendo el 0.02 – 0.03 % de su peso corporal (Sumar, 1983). Son de forma ovoides y están orientados dorso-ventral, con la cabeza del epidídimo en ventral y la cola del epidídimo en dorsal. Esto es diferente de carneros y toros, en los cuales la cola del epidídimo está ubicada en ventral (Bravo, 2002). En condiciones normales, ambos testículos son del mismo tamaño, firmes, con un movimiento libre dentro del escroto (Sumar, 2002) y presentan una variación de tamaño relativa a la edad (Tibary y Vaughan, 2006).

Epidídimo

El pequeño epidídimo está firmemente conectado con los testículos y formado por cabeza, cuerpo y cola (Sumar, 2002). La cabeza es más larga que la cola (Bravo, 1995) y se encuentra craneoventralmente al testículo. El cuerpo se extiende en medial y dorsocaudal a la cola, la cual se ubica dorsal al testículo (Fowler, 1998). La cabeza y el cuerpo son sitios para la maduración espermática, mientras que la cola está asociada al almacenamiento de

los esperamatozoides (Elwishy, 1988). La cola se encorva para dar origen al conducto deferente. El conducto deferente tiene una longitud promedio total de 40 cm (Smith *et al.*, 1994) y es muy delgado en su inicio (1 mm) pero se engrosa (2 mm) cuando alcanza la cavidad abdominal (Sumar, 1983). Su recorrido va desde la cola del epidídimo a través del anillo inguinal hacia la uretra, caudalmente al cuello de la vejiga donde existe una pequeña ámpula (Bravo *et al.*, 2002).

Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias son la próstata y las glándulas bulbouretrales, ya que los camélidos no poseen glándulas vesiculares, siendo esta ausencia una de las características más resaltantes en los camélidos (Bravo *et al.*, 2000). La próstata de la alpaca tiene forma de H; descansa dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga. Tiene un tamaño de aproximado de 3 por 2 cm, y no es fácil palparla por el recto (Sumar, 2002). Las dos glándulas bulbouretrales son pares, ovoides y están localizadas de 7 a 8 cm de la próstata a los lados de la uretra, en la salida pélvica (Novoa y Leyva, 1996).

2.2.2 Pubertad

En general, la pubertad ocurre cuando el macho es capaz de producir espermatozoides (Sumar, 2002).

Al nacimiento, los testículos son pequeños y flácidos, miden escasamente 0.5 cm de diámetro mayor (Vilela, 1995), no están presentes en el escroto (Bravo *et al.*, 2000) y a la palpación digital no hay diferencia entre el testículo y el epidídimo (Bravo, 2002). Si bien el mecanismo del descenso testicular no está bien descrito (Tibary and Memon, 1999), definitivamente, a los doce meses de edad, los testículos deben estar en el escroto y las partes del epidídimo también deben ser reconocidas por palpación (Bravo, 2002). También, al nacimiento, el pene está adherido por completo al prepucio y las concentraciones de testosterona en sangre están en niveles basales (60-90 pg/ml) (Bravo, 2002).

En los túbulos seminíferos de las alpacas, la espermatogénesis comienza a los 12 meses de edad (Montalvo *et al.*, 1979; Galloway, 2000), aunque algunos autores señalan que se inicia en algunas alpacas desde los 16 meses, y en otras hasta los 26 meses (Montalvo *et al.*, 1979). Sin embargo, la madurez sexual generalmente es determinada por la edad en la cual desaparece la adhesión entre el pene y el prepucio y los machos se vuelven capaces de tener una erección completa, y no desde el momento en que se está produciendo espermatozoides viables.

Conforme los machos maduran, los testículos se agrandan y los niveles de testosterona en sangre incrementan a más de 1000pg/mlaproximadamente a los 20 meses de edad en la mayoría de alpacas (Bravo, 1995; 2000). Las adherencias desaparecen en forma gradual con el crecimiento del animal bajo la influencia de la testosterona. A pesar de que al año de edad, los machos muestran interés sexual por las hembras, sólo cerca del 8% de las alpacas macho muestran una separación completa de las adherencias entre el pene y el prepucio y son capaces de realizar la copulación. A los dos años de edad, cerca del 70% de los machos no tiene adherencias, y 100% a los tres años de edad (Sumar, 2002).

Existe una variación en la edad en que desaparece la adherencia pene-prepucial, la que podría explicarse parcialmente por la nutrición (Fernandez-Baca, 1993) como si hubiese una correlación entre el tamaño del animal con la medida del testículo (Galloway, 2000). La variación en el tamaño testicular a distintas edades o en el tamaño corporal, sugiere la influencia de otros factores, como la genética (Galloway, 2000).

2.2.3. Estacionalidad

La alpaca es considerada como una especie de actividad reproductiva estacional en condiciones naturales, que tiene lugar entre los meses de Enero a Abril (Bustinza, 2001), siendo éstos meses más cálidos del año donde hay lluvias y abundante forraje verde (Sumar, 1996). En el caso de los machos, son capaces de producir eyaculados fértiles todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas, la calidad del semen, así como la

libido, se ven influenciados por la estación del año y disponibilidad de alimento (Montalvo *et al.*, 1979).

Los factores responsables del inicio y término de la actividad reproductiva en condiciones naturales de crianza, no son bien conocidos (Sumar, 1997). Sin embargo, más allá de los factores nutricionales o de manejo, se cree que factores ambientales como la temperatura, humedad y luz, así como estímulos visuales u olfatorios tienen influencia en los centros del sistema nervioso central que controla el comportamiento reproductivo (Brown, 2000).

Se ha encontrado un grado importante de estacionalidad en la estructura microscópica del testículo de la alpaca por un grado de involución de los túbulos seminíferos que ocurre en la estación no reproductiva que es heterogénea y responde a un ordenamiento alternante muy marcado (Nuñez *et al.*, 2007).

Giuliano *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la estacionalidad en llamas en invierno y verano, llegando a la conclusión que la concentración espermática y las anomalías son diferentes en una de otra, presentando menos concentración y más anomalías en la estación de verano.

2.2.4. Comportamiento sexual, cópula y eyaculación

Las observaciones en campo han mostrado una conducta peculiar de la alpaca macho. Esta muestra una actitud activa y en ocasiones agresiva durante el apareamiento, en contraste con la actitud pasiva de la hembra (Sumar, 2002). Los machos pelean para hacer valer su dominio sobre los otros machos, usando su cuello, pecho y dientes caninos para establecer su superioridad (Fowler, 1998).

La actividad sexual de la alpaca en campo abierto es particularmente intensa durante la primera semana de la época de empadre, con alrededor de 70% de montas a hembras al

menos una vez (Fernandez-Baca *et al.*, 1972). Posteriormente, la actividad sexual decrece a pesar de la presencia de hembras receptivas, alcanzando un 0% en algunos casos, pero después de cambiar los machos, el empadre se reactiva alcanzando niveles comparables como los de la primera semana (Sumar, 1996). La asociación continua de machos y hembras inhibe de alguna manera, después de un determinado periodo, la actividad sexual de los machos, situación que en ocasiones impide el apareamiento de hembras que reanudan el estro después de un apareamiento estéril o de muerte prematura del embrión (Sumar, 2002).

Basado en observaciones, fue desarrollado un sistema de empadre llamado “alternativo o rotativo”. El sistema trabaja bien en rebaños que tienen más de 100 hembras, como es común en el sur de Perú. Los machos son usados en un promedio de 6% para toda la temporada de empadre de 60 días. La mitad de los machos son usados por una semana y rotan con el otro grupo de machos la siguiente semana. Al alternar los machos, la libido y el empadre permanecen altos y se maximiza la oportunidad de las hembras para aparearse al menos una vez. El uso del empadre rotativo en una gran cooperativa alpaquera en Perú dio como resultado un incremento en la porcentaje de nacimientos de 57% a 81% (Novoa *et al.*, 1970).

El comportamiento sexual demostrado por los camélidos sudamericanos machos puede ser dividido en dos fases: cortejo y cópula (Morton *et al.*, 2008). Las hembras no preñadas están en estro continuamente y cuando los machos son introducidos al rebaño, ellos van a intentar aparearse con la primera hembra receptiva que encuentren, mediante la detección de feromonas usando la respuesta “flehmen” El cortejo empieza con el macho persiguiendo activamente a las hembras receptivas e intentando montarlas (Brown, 2000). Si la hembra está receptiva, se colocará en posición de cúbito esternal pero si la hembra se niega, lo pateará, escupirá y se irá corriendo; el macho aun continuará por algunos minutos, y si la hembra se sigue negando, luego cambiará por otra y comienza una nueva persecución. Cuando muchas hembras están disponibles, la elección de la hembra para el empadre se da al azar. El macho persigue a la hembra hasta que ella se recuesta (Bravo,

2002). La respuesta Flehmen en los camélidos no es tan notoria como en toros y carneros. El macho olfateará la zona perianal de la hembra o estiércol del corral y elevará su cabeza.

El proceso de la cópula en los camélidos es único, por muchas razones: duración de la cópula, tiempo de eyaculación, lugar de depósito del semen, y comportamiento del macho (Bravo, 2002). Esta fase ocurre cuando la hembra adopta la posición de cópula en decúbito ventral con las extremidades inferiores metidas debajo del cuerpo (England et al. 1971). El macho cubre a la hembra, apretando los hombros de la hembra con sus codos, y su metatarso lo apoya en el suelo, lateral a los de la hembra (Novoa, 1970). El pene se vuelve rígido, y el proceso uretral empieza a realizar movimientos semi-rotativos. Cuando la vulva es localizada, el macho se acerca más a la hembra, y posiciona sus corvejones paralelos a los de ella. Además, la espalda del macho está es recta; sin embargo, cuando ya se dio la penetración, el espalda del macho se encorva y la región sacra del macho se coloca en una posición vertical y muy cerca al perineo de la hembra (Bravo, 2002). El macho muestra su excitación mordiendo las orejas de la hembra, con su cola moviéndose de arriba para abajo, la dilatación y contracción de los ollares y la vocalización (Novoa, 1970). El sonido gutural característicos de los machos durante el empadre es un aspecto integral en la liberación de la LH preovulatoria (Bravo, 1994). La duración de la cópula es determinada por el macho, y puede durar de 5 a 50 minutos (promedio de 25 minutos). La competencia entre machos acortará el tiempo, especialmente cuando un grupo de machos están montando a varias hembras, como ocurre en Perú (Bravo, 2002).

El macho penetra la cérvix con el pene, y va depositando el semen continuamente en los dos cuernos uterinos usando leves movimientos de empuje, como lo confirma un trabajo de palpación uterina vía laparotomía durante la cópula (Franco *et al.*, 1981; Bravo, 1994, 2002). La examinación del útero 24 horas después de la monta evidencia hemorragia, inflamación, edema e hiperemia del endometrio, posiblemente por el trauma de los movimientos hechos por el pene o por una reacción inflamatoria del plasma seminal (Velasquez y Novoa, 1999; Bravo, 2002). Este proceso inflamatorio dura entre 3 a 4 días y se vuelve más severo si la hembra tiene más de dos cópulas (Bravo, 2002).

2.2 COLECCIÓN DE SEMEN

El comportamiento sexual varía de acuerdo a la especie, y en el caso particular de los camélidos sudamericanos, se presentan características muy peculiares. Como la posición en el apareamiento es decúbitoventral y el animal presenta un temperamento nervioso, hace que la obtención de semen presente serias dificultades (Bustinza, 2001). La colección de semen en camélidos sudamericanos presenta dificultades como: la duración de la cópula, la posición de cópula, el lugar de depósito del semen y el tipo de eyaculación, así como el aspecto del eyaculado, su extrema viscosidad y lo dificultoso de su manejo, esto hizo que durante varias décadas se investigue una técnica óptima para poder extraer este semen y poder manejar los espermatozoides sin que estos pierdan su capacidad fecundante (Solís, 1997).

Los reportes sobre métodos de colección son diversos (Huanca y Adams, 2007); desde el primer reporte de Mogrovejo (1952) quien colectó semen de alpacas, utilizando una funda de látex colocada intravaginalmente antes de la cópula, después de la monta se retiraba la funda que servía de recipiente de semen. Con esta técnica se logró colectar semen pero presentaba algunos inconvenientes ya que se interfería con la cópula normal y alargaba el tiempo de monta más allá de los valores normales. También, la colocación de la funda dentro del tracto genital y su fijación ofrecía serias dificultades y con frecuencia provocaban lesiones que inhabilitaban a la hembra para su uso posterior. San Martín (1961) utiliza un método el cual se usa trozos de esponja que se introducen en la parte anterior de la vagina y que absorben el semen y otros fluidos vaginales, sirviendo como contenedores. El inconveniente de este método es que el semen que logra obtener es muy contaminado y está mezclado con los fluidos del tracto genital femenino, lo cual hace que se diluya el semen y lo contamine con bacterias, dificultando así su evaluación, por lo que no se recomienda su uso para fines de inseminación artificial. Por lo tanto, estos dos métodos interfieren con la normal eyaculación y dan como resultado un tiempo menor de cópula, movimientos continuos del macho, formación de espuma y daño al espermatozoide (Sumar, 1983; Johnson, 1989; Bravo, 1995) y en consecuencia ya no se utilizan más (Bravo *et al.*, 2012). Otro tipo de colección fue por medio de una fístula en la uretra peniana, pero tenía como desventajas los cuidados post operatorios y la discapacidad del macho (Von Kubineck, 1974). En 1966, Fernández-Baca y Calderón

reportaron el uso de la electroeyaculación para la colección de semen de alpacas, utilizando un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, se obtuvieron muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año. Los resultados de electroeyaculación muestran gran variabilidad entre animales y aun entre el mismo animal, además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas anexas, semen contaminado y baja concentración espermática (Pacheco, 2008). Otras desventajas incluyen el requerimiento de una sedación profunda del animal o anestesia general, contaminación del semen por la orina, incapacidad para evaluar libido, concentración espermática variable y el bienestar animal (Sumar, 1983; Johnson, 1989; McEvoy et al, 1994; Bravo, 1995; Giuliano et al., 2002). Una práctica fácil y no invasiva es la colección por aspiración vaginal post cópula, sin embargo, las muestras de semen obtenidas generalmente están incompletas y contaminadas con sangre (Bravo *et al.*, 2000).

Posteriormente se reporta el uso de una vagina artificial adaptada de ovinos (figura 1), que si bien mejora la técnica de colección, aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada durante el tiempo de la cópula (Sumar y Leyva, 1981). En 1996, Gauly y Leindiger describieron el uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina artificial, lo que permite algunas mejoras en la técnica de colección, facilitando el mantenimiento de la temperatura. Igualmente, el uso de un maniquí (Sumar y Leyva, 1981; Garnica *et al.*, 1993) o la colección con hembra receptiva (Huanca y Gauly, 2001) son alternativas para la colección de una muestra de semen fisiológicamente normal; sin embargo, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí; mientras que el uso de hembra receptiva genera incomodidades en el operador. Las ventajas de la vagina artificial para la colección de semen incluyen la confiabilidad y no requerir anestesia como en el caso de la electroeyaculación. Éste es el método más común de usar para obtener muestras de semen para los ensayos de la inseminación artificial en alpacas y llamas (Bravo *et al.*, 2012).

Investigaciones previas han demostrado que el método utilizado para la colección de semen en alpacas ha influido sobre la calidad espermática del mismo. Estudios reportan que la

colección de semen con vagina artificial con el apoyo de una hembra receptiva permite obtener mejores características de volumen, motilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides vivos (Dávalos y Olazabal, 2002). Alarcón (2012) reportó diferencias físicas del semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial, en el cual las variables como volumen, motilidad y el número de espermatozoides vivos fueron superiores en el semen colectado por aspiración vaginal, en tanto que la concentración espermática fue superior en el semen obtenido con vagina artificial. Asimismo, el 90% de los eyaculados colectados con vagina artificial presentaron alta viscosidad en comparación con el 10% de los eyaculados recuperados por aspiración vaginal. Otras investigaciones reportan el uso de una estructura similar a la cervix en la vagina artificial mejora la duración de la cópula y baja la incidencia de anomalías en la pieza intermedia y cola del espermatozoide. También, la presencia de hembras durante la colección no presenta ningún efecto en el largo de la cópula o en la calidad del semen (Morton *et al.*, 2006).

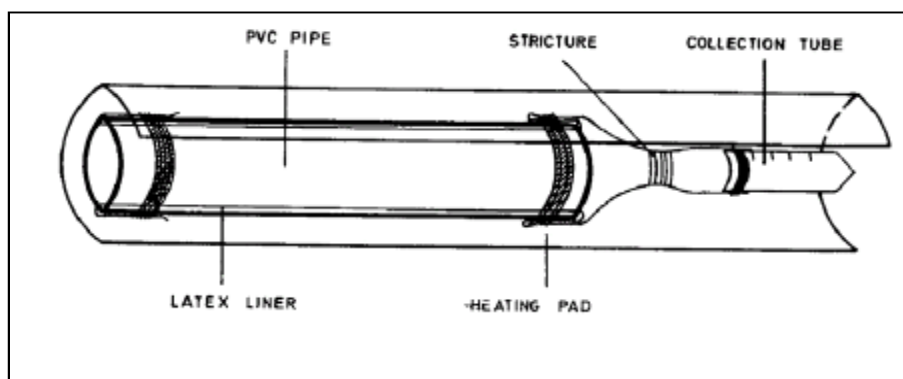


Figura 1. Vagina artificial modificada para la colección de semen de alpacas (Bravo *et al.*, 1997)

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos del macho (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor (Garner y Hafez, 2002). Para los camélidos, como sucede con su anatomía reproductiva, el semen también presenta características particulares.

Los eyaculados de los camélidos están caracterizados por un reducido volumen y baja concentración de espermatozoides comparando con otros animales de producción. Los parámetros como volumen, color, motilidad, concentración espermática, vitalidad y morfología son altamente variables entre machos y entre eyaculados colectados del mismo macho. Potencialmente, esto puede conducir a problemas para obtener eyaculados de calidad aceptable para la preservación de semen e inseminación artificial (Von Baer y Hellemann, 1999; Raymundo *et al.*, 2000). Además, algunos trabajadores han notado que el eyaculado de alpacas y llamas no es fraccionado, por tanto la calidad del semen es uniforme desde el comienzo hasta el final de la copulación. Las características físicas y biológicas del semen del camélidos sudamericanos también varían dependiendo de las condiciones de colección, por ejemplo, el método de colección, fertilidad y libido del macho, temperatura ambiental, etc. (Tibary y Vaughan, 2006). Por ejemplo, el volumen, la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos y la duración de la cópula fueron diferentes en los diferentes días de colección (Bravo *et al.*, 1997a). Algunos de los parámetros de las características del semen de alpaca según el método de colección están resumidos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Métodos de colección de semen de alpaca y las características del semen

| Especie | Técnica de colección | Volumen, ml (rango) | Esperm. x 10 ⁶ por ml | % Motilidad (rango) | % Normales | Referencia |
|---------|---------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------|-------------|-------------------------------|
| Alpaca | Funda vaginal | 1.9 (0.4 – 6.6) | 33.0 | Bajo | 41 | Mogrovejo, 1952 |
| Alpaca | Electro eyaculación | (1.1 - 1.8) | 0.001 – 2.55 | Bajo | - | Fernandez-Baca, 1965 |
| Alpaca | Fístula uretral | 6.6 | 0.6 | (0 - 85) | - | Von Kubicek, 1974 |
| Alpaca | VA con maniquí | 3.0 | 600 | - | - | Sumar <i>et al.</i> , 1986 |
| Alpaca | VA con maniquí | 1.7 ± 0.2 (0.4 – 4.3) | - | 50 | - | Garnica <i>et al.</i> , 1993 |
| Llama | VA con hembra | 2.4 (0.2 – 6.5) | 106.8 (15.0 - 640) | 15 - 50 | 90.6 | Gaully <i>et al.</i> , 1996 |
| Alpaca | VA con maniquí | 1.9 ± 0.4 | 82.5 – 250 | 85 ± 5.2 | 75.9 ± 2.1 | Bravo <i>et al.</i> , 1997 |
| Alpaca | VA con maniquí | 2.6 ± 1.8 | 0.06 ± 0.03 | 49.7 ± 22.6 | - | Raymundo <i>et al.</i> , 2000 |
| Alpaca | VA con maniquí | - | - | 68.2 | - | Bravo <i>et al.</i> , 2000 |
| Alpaca | VA con hembra | 1.8 ± 0.8 (0.6 – 3.8) | 17.6 ± 26.1 (0.05 – 92.9) | - | 51.0 ± 12.4 | Flores <i>et al.</i> , 2002 |
| Alpaca | VA con maniquí y hembra | 1.73 ± 0.1 | 0.575 ± 0.083 | 68.9 ± 4.9 | 86 | Dávalos y Olazabal, 2002 |
| | VA con maniquí sin hembra | 1.03 ± 0.04 | 0.328 ± 0.043 | 34.2 ± 5.3 | 85 | |

VA: Vagina artificial

(Morton *et al.*, 2008)

El color del semen de las alpacas ha sido descrito como blanco lechoso a blanco cristalino (Sumar, 2002). Aunque el color del semen de alpacas y llamas podría depender de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Tibary y Vaughan, 2006); es predominante de color blanquecino ya sea colectado por electroeyaculación o por vagina artificial (Garnica *et al.*, 1993).

Una de las características físicas más importantes en el semen de camélidos es la gran viscosidad, la que dificulta su manejo durante los procedimientos en el laboratorio

(pipetear, frotis por extensión), dificulta determinar parámetros como concentración espermática y motilidad y su mezcla con dilutores (Garnica et al., 1993; Tibary y Vaughan, 2006). El grado de viscosidad varía entre machos (Tibary and Memon, 1999) y disminuye con el incremento de número de eyaculados en cualquier día (Bravo et al. 1997). Dicha viscosidad se debe al plasma seminal, que viene a ser la fracción líquida del semen después de haberse separado los espermatozoides por centrifugación o filtración (Illera, 1994).

El promedio del volumen de cada eyaculado en alpacas varía entre 1 a 2 ml y el rango varía desde menos de 1 ml hasta 7 ml, aproximadamente (von Kubicek, 1974; Fowler, 1998; Garnica et al., 1995). Por lo general, el volumen es menor cuando se colecta por electroeyaculación que usando la vagina artificial (Tibary and Memon, 1999). Los porcentajes en el semen de alpaca consisten en 11.5% de espermatozoides y 88.5% de fluido seminal (Garnica et al., 1993).

Los valores de pH proporcionados por varios autores se acercan mucho a la neutralidad, con cierta tendencia a alcalinidad ligera (Sumar, 1991). Los valores de pH promedio varían de 7.2 a 7.5 (Bravo et al., 1997b). Además, se ha demostrado que la frecuencia de eyaculados no tiene mayores efectos en los valores de pH (Galindo, 1995).

La concentración espermática varía de 30 000 hasta 150 millones de espermatozoides por ml, aproximadamente en alpacas (Bravo, 1995; Garnica *et al.*, 1995; Gauly and Leidinger, 1996). Las grandes variaciones son atribuidas a los diferentes animales, tipos de colección de semen y números de eyaculados (Morton *et al.*, 2008).

Los espermatozoides de los camélidos muestran una motilidad individual por medio de la contracción del flagelo y solo en un sitio, como un movimiento oscilatorio. La motilidad debe ser observada inmediatamente después de la colección del semen (Bravo, 2002). El espermatozoide incrementa su motilidad progresiva cuando el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary and Memon, 1999).

El plasma seminal de las alpacas está compuesto por las secreciones de las glándulas anexas, las que son vertidas hacia la uretra durante la eyaculación, generándose

así la mezcla con los espermatozoides (Sumar, 2002). Dichas secreciones contienen diversos componentes bioquímicos que regulan diferentes funciones espermáticas (Barrios *et al.*, 2000), y que por la presencia de mucopolisacáridos confieren la viscosidad al plasma (Garnica *et al.*, 1993). La disminución de la viscosidad depende de cada macho y tiende a disminuir con el aumento de eyaculados en un día (Tibary y Vaughan, 2006).

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, ya que en el apareamiento natural actúa como portador y protector de los espermatozoides, siendo de suma importancia en el mantenimiento de la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Hafez, 2002). Sin embargo, es posible inducir la preñez por inseminación empleando espermatozoides epididimarios (Banda, 2009). Incluso, la influencia del plasma seminal sobre los espermatozoides durante el proceso de criopreservación se torna discutible. Es así que, algunos autores refieren la presencia de sustancias protectoras en el plasma seminal (Parrilla *et al.*, 2004) las cuales tendrían efectos positivos, como el aumento de resistencia de los espermatozoides al shock de frío (Barrios *et al.*, 2000). No obstante, en varias especies, algunos autores han observado un efecto perjudicial sobre la supervivencia espermática post-descongelación por parte de algunas fracciones del plasma seminal, como son la fracción prostática de los perros (England *et al.*, 1992) o la secreción de las vesículas seminales de carnero (Ashworth *et al.*, 1994) y toro (Way *et al.*, 2000).

2.3.1 Características bioquímicas

La composición bioquímica del semen de camélidos es similar al reportado de otras especies ganaderas (Tibary y Vaughan, 2006). En el cuadro 2, se describe el análisis bioquímico del plasma seminal de la alpaca. Las concentraciones de ácido cítrico (promedio 4.3 mg/dl, rango 3.1 – 6.0 mg/dl) y fructosa (promedio 5.0 mg/dl, rango 3.9 – 6.6 mg/dl) del semen de alpaca fueron encontradas independientes de la edad del animal y mucho menos en comparación con toros, carneros, verracos, padrillos y dromedarios, posiblemente debido a la falta de las glándulas de la vesícula seminal (Garnica *et al.*, 1995). Altas concentraciones de fructosa y ácido cítrico se han observado en camellos (Elwishy,

1988). Altas concentraciones de glucosa puede servir como la fuente de energía primaria al espermatozoide.

Cuadro 2. Composición bioquímica del semen de alpacas

| COMPONENTES | ALPACA DE 3 AÑOS | ALPACA DE 6 AÑOS |
|----------------------------|------------------|------------------|
| Ácido cítrico (mg/dl) | 4.3 ± 0.3 | --- |
| Cloro (mEq/l) | 348 ± 32 | 404 ± 34 |
| Calcio (mg/dl) | 18 ± 1 | 18 ± 3 |
| Fósforo inorgánico (mg/dl) | 12 ± 2 | 8 ± 0.4 |
| Glucosa (mg/dl) | 7 ± 0.4 | 5 ± 0.3 |
| Fructuosa (mg/dl) | --- | 6 ± 0.1 |
| Lípidos (mg/dl) | 86 ± 10 | 95 ± 10 |
| Fosfolípidos (mg/dl) | 29 ± 1 | 29 ± 1 |
| Nitrógeno total (mg/dl) | 548 ± 50 | 647 ± 32 |
| Proteína total (g/dl) | 3 ± 0.3 | 4 ± 0.2 |
| Albúminas (g/dl) | 2 ± 0.3 | 2 ± 0.2 |
| Globulinas (g/dl) | 1 ± 0.1 | 2 ± 0.2 |

(Garnica *et al.*, 1993)

Datos de camellos bactrianos (Chen *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1985; Zhao *et al.*, 1992; Pan *et al.*, 2001, 2003) y alpacas (Adams *et al.*, 2005; Ratto *et al.*, 2005, 2006) indican que el semen de los camélidos contiene un factor que induce la ovulación. El plasma seminal induce la ovulación en hembras después de su colocación en la vagina o en el útero de la hembra sin la necesidad de la monta natural (Chen *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1985; Sumar, 1994) o por una inyección vía intramuscular (Chen *et al.*, 1985; Pan *et al.*, 1992; Adams y Ratto, 2001). La composición del factor inductor de la ovulación es desconocida pero es diferente a la GnRH (Zhao *et al.*, 1992; Paolicchi *et al.*, 1999).

2.3.2 Morfología espermática

El espermatozoide es una célula conformada por una cabeza espermática y una cola o flagelo, y ambos están rodeados por una membrana espermática o plasmolema (Sutovsky y Manandhar, 2006).

De adentro hacia afuera, la cabeza espermática está compuesta por un núcleo en donde el ácido desoxirribonucleico (ADN) ha sido parcialmente reemplazado durante la espermiogénesis por protaminas que ayudan a la hipercondensación del núcleo espermático en una forma compacta e hidrodinámica que permite la motilidad espermática y la penetración espermática a través de las capas del óvulo (Sutovsky y Manandhar, 2006). Los núcleos de los espermatozoides de la mayor parte de las especies contienen sólo protaminas, mientras que en otras especies contienen cantidades variables de histonas más grandes, ricas en arginina (Garner y Hafez, 2002). El extremo anterior del núcleo está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo a manera de casquete, que contiene acrosina, hialurodasa y otras enzimas hidrolíticas, que participan en el proceso de fecundación (Garner y Hafez, 2002).

La cola espermática provee la fuerza motil al espermatozoide. Está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda su longitud de la cola, comprende el axonema. El axonema, como tal, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segmento medio, esta disposición 9 + 2 de los microtúbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática (Garner y Hafez, 2002). El segmento principal, que se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema al centro y sus fibras gruesas asociadas (Garner y Hafez, 2002). Además, esta sección está rodeada por una vaina fibrosa que provee soporte al axonema (Sutovsky y Manandhar, 2006). El segmento caudal o terminal contiene solo el axonema central cubierto por la membrana espermática (Garner y Hafez, 2002). El axonema es que le da

motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 + 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes.

Los espermatozoides maduros de camélidos sudamericanos muestran las mismas características anatómicas con otros mamíferos. La gota citoplasmática, que suele desprenderse de los espermatozoides tras la eyaculación, está compuesta de citoplasma residual.

La longitud de los espermatozoides de los camélidos es menor que los de toro, búfalo, carnero, asno y garañón (Tibary y Anouassi, 1997). En la alpaca, las dimensiones de la cabeza es 6.1 +- 0.6 μ m de largo y 3.6 +- 0.3 μ m de ancho (Buendia *et al.*, 2002).

2.3.3 Anormalidades del espermatozoide

Muchas anormalidades se han reportado en el semen de los camélidos, con variaciones de la frecuencia de ésta según la especie. Todas las anormalidades encontradas en otros tipos de ganado se pueden encontrar en los camélidos (Tibary y Memom, 1999).

En el semen de las alpacas, las proporciones de espermatozoides vivos y morfológicamente normales varían desde 58 – 83% y 71 – 84%, respectivamente (Bravo *et al.*, 1997b). Es así que, en los espermatozoides de alpacas se pueden encontrar anormalidades como colas con curvaturas y colas dobles (9 – 15%), cabezas libres y cabezas dobles (3 -13%) y la presencia de gota citoplasmática (1 – 7%) (Lichtenwainer *et al.*, 1996). No obstante, los efectos de las muchas anormalidades en la fertilidad no han sido determinados (Tibary y Vaughan, 2006).

2.3.4 Factores que afectan las características del semen

El efecto de la duración de la cópula sobre las características seminales

Las características del semen de los camélidos están relacionadas al tiempo de la duración de la cópula. Se han hecho estudios en los cuales se cambia el tubo colector cada 5 minutos o se ha interrumpido la cópula a los 5, 10, 15 y 20 minutos. En general, la duración de la cópula no afecta al volumen del eyaculado, sin embargo, existen cambios en la concentración y porcentaje de espermatozoides vivos. La concentración se incrementa a los 20 minutos de copulación. Adicionalmente, la cópula interrumpida causa una mayor proporción de de espermatozoides muertos después de 15 minutos.

El efecto de colecciones sucesivas sobre las características seminales

Estudios sobre efecto de eyaculaciones sucesivas en las características del semen han demostrado que la concentración espermática y el volumen del eyaculado disminuyen en el tercer eyaculado sucesivo (Bravo, 2002).

El efecto macho sobre las características seminales

El efecto macho también afecta a las características del semen. La duración de la cópula, la concentración espermática, espermatozoides vivos y normales son las características que más varían. El volumen y la filancia también se ven afectados.

El efecto de la edad sobre las características seminales

En general, las principales características relativas a la edad del macho no varían significativa. La concentración espermática aparece ser menor en animales más jóvenes (Medina y Bautista, 2013).

2.4 CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones (Ávila *et al.*, 2006)

La criopreservación del semen contribuye a la expansión de técnicas reproductivas, como la inseminación artificial (AI) y la fertilización in vitro (Medeiros *et al.* 2002). La AI con semen congelado es esencial en trabajos de reproducción y selección contribuyendo a incrementar la producción de las especies domésticas. El semen congelado-descongelado asociado a otras biotecnologías reproductivas es usado para la preservación de especies en peligro de extinción y también para solucionar problemas de infertilidad en machos en humanos (Watson, 2000).

Grandes esfuerzos se están realizando en las técnicas de criopreservación con la meta de mejorar la viabilidad espermática. Sin embargo, la criopreservación induce a la formación de cristales de hielo dentro de la célula, estrés osmótico y por refrigeración que causan daños en la célula del espermatozoide, ruptura citoplasmática o, incluso, daños en el citoesqueleto o en estructuras relacionadas al genoma (Isachenko, 2003).

La alta viscosidad es común en el semen de los camélidos. Esto representa un desafío más para desarrollar la inseminación artificial. Muchas investigaciones citan la viscosidad natural del semen de los camélidos como el principal obstáculo que impide el desarrollo de la conservación y la inseminación artificial (Morton *et al.*, 2008).

2.4.1 Licuefacción del semen

La función de la gran viscosidad en el semen de los camélidos se desconoce pero se presume que crea una especie de reservorio de semen o que puede ser importante para mantener a los espermatozoides viables dentro del útero (Huanca y Adams, 2007).

El semen se vuelve líquido a las 23 horas (rango de 8 – 30 horas) después de la colección naturalmente. Varios métodos de licuefacción del semen, como el uso de enzimas (Bravo et al., 2000; Bravo, 2002) y agitación mecánica se han utilizado con cierto éxito para simplificar la manipulación y permitir la dilución, extensión, y congelación del semen.

Se diseñó un estudio para probar la efectividad de enzimas para licuar el semen (por ejemplo, colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa o tripsina), la colagenasa fue efectiva para eliminar la viscosidad del semen en cinco minutos con muy baja repercusión en las características del semen (Huanca y Adams, 2007).

Un método mecánico para reducir la viscosidad del eyaculado implica la aspiración y expulsión del eyaculado a través de una aguja; la técnica efectivamente reduce la viscosidad y tiene muy poca influencia en otras características del semen (Valdivia et al., 1999).

2.4.2 Dilutores de semen

La dilución del semen se realiza por razones técnicas y biológicas. Dentro de las razones técnicas, es que sirve para reducir el número de espermatozoides a la dosis requerida, manteniendo un volumen adecuado y obteniendo más dosis por eyaculado. Las razones biológicas son que los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, sistema amortiguador a los cambios de pH y un ambiente isotónico. Además, protegen a los espermatozoides del shock del frío cuando se enfrían y conservan así o

contra las injurias de la congelación cuando se congela el semen. También deben impedir la proliferación bacteriana (Evans y Maxwell, 1987).

Prácticamente todos los dilutores para semen fresco o congelado tiene como componentes básicos la yema de huevo o la leche calentada, o una combinación de estas dos (Hafez, 2002). Además, para mantener la osmolaridad y el pH del medio están las sustancias iónicas y no iónicas, azúcares simples como fuente de energía y antibióticos (penicilina, estreptomicina, etc.) para controlar el crecimiento bacteriano (Banda, 2009).

La leche tiene diversas propiedades que la hace uno de los componentes más usados en los dilutores de semen. Las proteínas de la leche son las que proveen dichas propiedades a favor de los espermatozoides durante la congelación, y pueden funcionar como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon y Maxwell, 2000). Es así que la caseína, la proteína que se encuentra en mayor proporción en la leche, muestra propiedades antioxidantes (Foote *et al.*, 2002). Sin embargo, la lactenina resulta tóxica para los espermatozoides, por lo que se convierte en práctica común calentar a temperaturas superiores a los 90°C la leche entera antes de ser usada, con lo que se logra inactivar dicha proteína (Salamon y Maxwell, 2000). La leche puede ser usada en distintas presentaciones, como leche entera (Sandoval, 2005), reconstituida (Salamon y Maxwell, 2000) o descremada (Sandoval, 2005). Asimismo, el uso de leche tratada a altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon y Maxwell, 2000).

La yema de huevo de gallina también se ha convertido en un componente común de los dilutores para la criopreservación de semen de diferentes especies durante los últimos 60 años. Se ha usado bien sola o combinada con citrato de sodio o amortiguadores orgánicos en la leche calentada o descremada, y ha sido probada en especies como toro, carnero, macho cabrío, verraco, garañón, equino, camélidos y especies silvestres (Hafez, 2002). Se ha demostrado que la yema de huevo sirve para proteger al espermatozoide del daño producido durante el enfriamiento y descongelamiento (Salamon y Maxwell, 2000); así como mejorar la fertilidad espermática (Lamia *et al.*, 2004). Esta acción protectora se

atribuye a las proteínas de baja densidad (LDL – low density proteins) (Moussa *et al.*, 2002). Las LDL están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, y presentan una forma esférica con un centro formado por triglicéridos, los cuales están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos (Hu *et al.*, 2010). Se cree que durante la congelación-descongelación, las LDL son desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las membranas espermáticas (Hu *et al.*, 2010). Por su parte, Moussa *et al.* (2002), Lamia *et al.*, (2004) y Hu *et al.* (2006) demostraron que las LDL son responsables del proceso de solidificación en la criopreservación, durante el cual se alterarían las estructuras de las LDL favoreciéndose la deshidratación de los espermatozoides, confiriendo así resistencia al shock térmico del proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, el mecanismo preciso por el que la yema de huevo ayuda a la protección de los espermatozoides no ha sido claramente establecido.

Asimismo, se sabe de algunos componentes de la yema de huevo que pueden tener un rol antagónico al efecto protector de las LDL. Demianowicz y Strezek (1996) separaron la yema de huevo en dos lipoproteínas: las LDL y las lipoproteínas de alta-densidad (HDL – high density proteins), y observaron que las LDL proveían una mejor protección al semen de cerdo que la yema entera, mientras que las HDL disminuyeron significativamente la motilidad espermática en comparación con la yema entera; y señalaron posteriormente que eso se debía a la presencia de gránulos en las HDL. Esto sugeriría que la yema de huevo puede contener algunos componentes dañinos que pueden reducir notablemente la motilidad espermática (Moussa *et al.*, 2002).

Los principales sustratos de energía para dilutores son: fructosa, sorbitol y glicerilfosforilcolina, los cuales se encuentran en el plasma seminal (Sandoval, 2005). Siendo la fructosa el azúcar principal del semen y la que proporciona los hidratos de carbono que son utilizados como fuente de energía de los espermatozoides móviles; es así que, para proveer energía al espermatozoide, los dilutores de semen deben incluir azúcares del tipo monosacárido (Garner y Hafez, 2002). Se ha reportado el uso de glucosa, manosa, maltosa o lactosa como fuentes de energía y protección de los espermatozoides (Banda,

2009). Otros carbohidratos (polisacáridos) no actúan como fuente de energía, pero son utilizados por su habilidad para preservar la motilidad espermática (Sandoval, 2005).

2.4.3 Crioprotectores

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará mas deshidrata y el gradiente osmótico al que está sometido será menor.

Bioquímicamente, es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetilsulóxido. Los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular.

2.4.3.1 Crioprotectores permeables

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH).

El dimetilsulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana. Su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular (García, 1984), modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se ha

sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para a criopreservación de la membrana (Porcu, 2001).

El glicerol ha sido usado exhaustivamente para la criopreservación de varios tipos celulares, incluyendo esperma mamífero (Rasul *et al.*, 2007), incluso desplazando el interés del uso de semen fresco hacia el uso del semen congelado (Hafez, 2002). Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimientos extra e intracelulares (Mazur, 1984). Su función a nivel extracelular consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y por tanto, minimizando el estrés osmótico (Mazur, 1984). EL glicerol atraviesa la membrana celular debido a su bajo peso molecular (Medeiros *et al.*, 2002), y reduce el estrés de enfriamiento de las células actuando a través de un mecanismo de “sal buffer”, deshidratando las células, consiguiendo disminuir el volumen de agua intra-celular disponible para congelarse, pero manteniendo el volumen celular (Rasul *et al.*, 2007), lo que evita el colapso de las células por una deshidratación excesiva (Medeiros *et al.*, 2002) y previniendo también la fractura de las soluciones de enfriamiento al reducir la expansión del volumen total de hielo durante la solidificación del agua (Rasul *et al.*, 2007).

El etilenglicol (EG) es un polialcohol ($C_2H_6O_2$) crioprotector cuyo peso molecular (62,07 g/mol) es inferior al del glicerol (92,10 g/mol) (Andrade, 2005). Es utilizado universalmente en la congelación de tejido ovárico (Rodrigues *et al.*, 2004) y de embriones de distintas especies (Nowshari y Brem, 2001). La utilización de EG como crioprotector, en la congelación del semen de toro, ha ejercido un menor efecto inhibitorio en la motilidad que el glicerol o el DMSO (Guthrie *et al.*, 2002), reduciendo la extensión de las conocidas “lesiones osmóticas” y presentando lo tanto, potencial como crioprotector alternativo al glicerol. Lo que también se ha demostrado en otras especies como en equinos (Ball y Vo, 2001) y caninos (Rota *et al.*, 2006).

El 1-2 propanediol ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies (Porcu, 2001).

2.4.3.2 Crioprotectores no permeables

Los agentes crioprotectores no permeables son sustancias de alto peso molecular que no pueden atravesar la membrana plasmática (Boiso, 2001). Son más efectivos protegiendo sistemas biológicos congelados a velocidades altas (Brockbank *et al.*, 2007), y asociados a agentes crioprotectores permeables (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Como no penetran en la célula, no son crioprotectores propiamente dichos, pero ejercen su acción promoviendo la deshidratación celular (Boiso, 2001).

Algunos de estos agentes no permeables tiene efectos protectores directos sobre la membrana celular (Brockbank *et al.*, 2007), como promover osmóticamente una rápida deshidratación celular, lo que previene la formación de cristales de hielo (Medeiros *et al.*, 2002); al mismo tiempo que sus grupos hidroxilo interactúan con los grupos fosfatos de los fosfolípidos de la membrana celular, reemplazando el agua alrededor de los fosfolípidos, evitando así el daño de la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw *et al.*, 1993). Además, en el medio extracelular, estos agentes aumentan la viscosidad del medio a bajas temperaturas, reduciendo así también la cristalización (De Leeuw *et al.*, 1993). Los más usados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona (PVP), dextrano, polietilenglicol (PEG) (Boiso, 2001).

2.4.4 Métodos de criopreservación

Existen diversos métodos para lograr las bajas de temperaturas y las subsiguiente viabilidad de las células criopreservadas. De acuerdo a la velocidad de congelación y descongelación, los métodos de congelación pueden clasificarse en: congelación lenta/descongelación rápida, congelación lenta/descongelación lenta, congelación ultrarrápida y vitrificación (Boiso, 2001).

En la congelación lenta, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable (Ávila-Portillo et al., 2006).

La descongelación lenta se lleva a cabo mediante el uso del congelador programable, mientras que en la descongelación rápida se realiza a temperatura ambiente o en baño de agua a 30°C o más para evitar la recristalización (Boiso, 2001).

La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones por Trouson en 1986. Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido (Ávila-Portillo et al., 2006).

La vitrificación se basa en la congelación rápida en una mezcla de altas concentraciones de crioprotectores, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un sólido amorfo, sin formación de hielo (Boiso, 2001).

2.4.5 Proceso de criopreservación de semen

El proceso de criopreservación del semen involucra tres fases: a) fase de enfriamiento, b) fase de congelamiento, y c) fase de descongelamiento (Santiani, 2003).

La fase de enfriamiento se lleva a cabo en dos partes: en la primera, el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C (Salamon y Maxwell, 2000) en un tiempo aproximado de 0.5 a 3 horas (Aisen *et al.*, 2000), con el propósito de reducir la motilidad espermática (Sandoval, 2005); entretanto, en la segunda parte, se mantiene el semen a 5°C por un periodo de 0.5 a 1.5 horas antes de iniciar la congelación, para lograr la estabilización celular (Aisen *et al.*, 2000).

Una vez terminada la fase de enfriamiento, se da un periodo de transición, en el que se adicionan sustancias crioprotectoras al semen diluido (Salamon y Maxwell, 2000), lo que permitiría una mayor estabilización de los espermatozoides en la solución (Ruíz, 2005). Cuando el crioprotector es agregado de forma abrupta se puede observar daño en la membrana plasmática, región acrosomal y configuración de la cola (Ávila-Portillo *et al.*, 2006), por tal motivo, para disminuir aún más los efectos tóxicos del agente crioprotector, el diluyente es dividido en dos fracciones, en donde la segunda fracción contiene el doble de concentración deseada del crioprotector, para que al ser mezclado con igual volumen del semen diluido en la primera fracción, se obtenga la concentración deseada de dicho agente crioprotector (Sandoval, 2005).

La siguiente fase es la de congelamiento, la que empieza cuando la temperatura llega a 5°C (Salamon y Maxwell, 2000). En esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Watson, 2000). Al llegar la temperatura a -10°C se inicia la formación de hielo del agua extracelular que ocasiona un incremento progresivo de concentración de solutos; es así que la fracción líquida se vuelve hipertónica, y debido a la diferencia de presiones, el agua intracelular sale de la célula (Madeiros *et al.*, 2002) como medida para mantener el equilibrio osmótico dentro de la solución (Boiso, 2001). Dicho periodo de cristalización se conoce como “rango crítico de temperatura” (Salamon y Maxwell, 1995), y es donde ocurren los principales daños en el espermatozoide (Kumar *et al.*, 2003).

Como método rutinario en muchos laboratorios se utiliza el método simple y rápido de suspender pajuelas o las ampollas en vapores de nitrógeno líquido por un periodo adicional antes de sumergirlas dentro del nitrógeno líquido (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Se sostiene que manteniendo las pajuelas 8 cm encima de nitrógeno líquido permite reducir la temperatura dentro de las pajuelas a -150°C en 15 minutos (Sandoval, 2005). Este método no requiere equipos especializados y, si bien tiene ciertos problemas, que incluyen tasas de enfriamiento no uniformes entre alícuotas del mismo eyaculado y dificultades en mantener reproducibles las condiciones de congelación; puede dar lugar a buenas tasas de supervivencia (Ávila-Portillo *et al.*, 2006)

Por último, la fase de descongelamiento se realiza usualmente al sumergir las pajillas de semen en agua en baño maría entre 37°C -50°C por un periodo de tiempo que varía entre algunos segundos hasta 5 minutos (Aisen *et al.*, 2000). Se opta por la descongelación rápida ya que los espermatozoides tienen que volver a pasar por el “rango crítico de temperatura” para evitar así la recrystalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000).

2.4.6 Factores críticos en el proceso de criopreservación

Durante el proceso de criopreservación se produce diversos daños en el espermatozoide, un daño letal y un daño subletal. El daño letal, disminuye la proporción de células viables. Este daño es producido principalmente por las siguientes causas: el cambio de temperatura, el estrés tóxico y osmótico, y la formación de hielo extracelular. El daño subletal produce una disfunción en la población de células sobrevivientes. Este es principalmente producido por: la desestabilización de las membranas, y el estrés oxidativo (Watson, 2000).

En condiciones normales, entre un 40 a 50% de espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación no sobreviven. De la proporción sobreviviente solo una minoría de espermatozoides muestra una motilidad progresiva vigorosa, presentándose en la mayoría diferentes grados de daño en la motilidad (Watson, 2000).

Después del proceso de criopreservación puede conseguirse un aceptable porcentaje de espermatozoides motiles, sólo una pequeña proporción de estos permanece sin cambios funcionales (Salamon y Maxwell, 2000). Durante el proceso de criopreservación se incrementa la capacitación espermática en comparación con espermatozoides de semen fresco.

El estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación está relacionado con la pérdida de la función espermática. Los espermatozoides criopreservados presentan

disminución de la motilidad progresiva (Tselkas *et al.*, 2000), viabilidad (Wang *et al.*, 1997), alteración en la integridad de sus membranas (Wang *et al.*, 1997; Tselkas *et al.*, 2000) y daño en la estructura del ADN espermático (Baumber *et al.*, 2003). Es por ello, que la prevención de la producción de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de criopreservación es importante para mantener una buena calidad espermática (Santiani, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

Este estudio se realizó durante los meses de octubre a diciembre del 2013 en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal – Sección de Biotecnología Reproductiva de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicado en el distrito de San Borja, provincia de Lima, departamento de Lima, Perú.

3.2 Descripción del material experimental

Se utilizó 4 alpacas machos, blancos, de raza huacaya, enteros y adultos del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, que fueron previamente entrenados para la colección con vagina artificial con una hembra receptiva.

3.3 Preparación de materiales

Para los efectos del experimento, se utilizó el dilutor comercial Triladyl® que está compuesto por tris, yema de huevo y glicerol como crioprotector, siguiendo las indicaciones de preparación y conservación del fabricante (Apéndice 1). La yema fue obtenida a partir de huevos frescos de gallina. El dilutor se preparó en los mismos días de la colección de semen.

Los materiales como portaobjetos, cubreobjetos, tubos Falcon (15 y 50 ml), solución hipoosmótica de 50 mOsm/Kg, dilutor y colorante (eosina nigrosina) se mantuvieron a una temperatura de 37°C para evitar shock térmico en los espermatozoides.

3.4 Colección de semen

Se realizaron colecciones semanales durante 6 semanas a cada macho utilizando el método de colección con vagina artificial con una hembra receptiva. La vagina artificial consta de un tubo de PVC de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro que contiene aire a presión y agua caliente que debe mantenerse entre 40 a 42 °C y que en uno de sus extremos se adhiere un tubo Falcon de 50 ml. La vagina artificial se envolvió con una frazadilla eléctrica para mantener la temperatura. Se consideró un tiempo máximo de monta de 20 minutos. Se registró la duración del tiempo de colección por macho.

3.5 Evaluación y tratamiento del semen fresco

Las muestras de semen colectadas fueron mantenidas a 37°C. Se evaluaron las características macroscópicas como volumen (ml), color, viscosidad (cm) y las microscópicas como motilidad (%), concentración espermática (espermatozoides/ml), funcionalidad de la membrana (% de positivos al test de endosmosis (HOST)), vitalidad (% de vivos) y morfología (% de espermatozoides normales).

Para el volumen, se comparó el tubo utilizado para la colección con un tubo del mismo tamaño que tenía mediciones desde 0.5 a 2.5. El color se determinó usando una escala de tonalidades de blanco. Para la viscosidad, se aspiró una gota de semen con una aguja de 18°G colocada en una jeringa de tuberculina y, utilizando el bisel hacia arriba, se colocó una gota de semen en una lámina portaobjetos y se estiró. Con una regla se midió el largo máximo formado por el hilo de semen de la muestra.

Para la motilidad, se colocó 10 μ l de semen en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, los dos atemperado a 37°C. Sobre una placa térmica a 37°C, se observó al microscopio con un aumento de 40X. La evaluación se basó en determinar el porcentaje de espermatozoides que se movían en su sitio para el semen fresco y el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo para el semen refrigerado y descongelado. Se observó 10 campos de la muestra y se determinó el promedio general. En la concentración espermática, se utilizó una dilución de 1:10 (1 parte de semen y 9 de agua) y se contó en la cámara de Neubauer. Después del conteo se aplicó la fórmula correspondiente para hallar la cantidad de espermatozoides/ml. Para la prueba de funcionalidad de la membrana, se utilizó un medio hipoosmótico de 50 mOsm/Kg y se añadió 25 μ l de semen en 500 μ l de solución, se dejó incubar a 37° por 20 minutos. Terminado el tiempo de incubación, se utilizó un fijador para frenar la reacción y realizar el conteo con el microscopio, con un aumento de 40X. La evaluación se realizó según lo descrito por Jeyendran *et al.* (1894). Para la vitalidad, se utilizó la coloración supravital eosina nigrosina, mezclando la misma proporción de eosina que de semen (10 μ l) y realizando un frotis por extendido. Se evaluó a 40x, contando vivos y muertos hasta 100 espermatozoides. La evaluación se realizó según Morton *et al.* (2008). Para observar morfología, se utilizará el frotis anterior y se contó 100 espermatozoides, clasificándolos como normales y anormales (anormalidad de cabeza, cola, pieza intermedia, gota citoplasmática), hasta completar 100 espermatozoides según lo descrito por Morton *et al.* (2008).

Después de ser evaluadas, cada muestra inmediatamente se dividió en dos fracciones iguales y se les agregó 2 ml de dilutor comercial. Para romper la viscosidad del semen, cada fracción fue tratada con diferentes métodos físicos: la fracción (A) fue

sometida a la acción mecánica mediante 10 pasajes por una aguja n° 18 con una jeringa de 5 ml, con la cual el semen fue siendo aspirado y expulsado delicadamente por las paredes del tubo; y la fracción (B) fue sometida a una agitación manual, realizando movimientos horizontales y verticales en 20 segundos. Luego, ambas fracciones fueron centrifugadas a 802 G por 10 minutos.

3.6 Refrigeración y congelación de semen

Para el presente estudio, solo se refrigeró los eyaculados que en la evaluación en fresco tuvieron más de 35% de motilidad y solo congeló los eyaculados que en la evaluación en refrigerado presentaron más del 35% de motilidad.

Cumplido el proceso de centrifugación, se retiró el sobrenadante y el pellet se reconstituyó con 2 ml del dilutor comercial a 37°C. Se refrigeró los dos tubos con una velocidad de enfriamiento promedio de 1°C/5 min, para disminuir la temperatura de 37°C a 5°C. El tiempo total de enfriamiento fue aproximadamente 2.5 horas. Se reevaluó las variables de motilidad, funcionalidad de la membrana, vitalidad y morfología.

Para el proceso de congelación, se llenó cuatro pajillas plásticas de 0.5 ml por cada tratamiento por cada macho, y se selló el borde libre de cada una de éstas pajillas con alcohol polivinílico. Luego, las pajillas fueron colocadas horizontalmente en una canastilla y posicionadas por encima del nitrógeno líquido contenido en una caja de tecnopor, primero a una distancia de 17 cm de la base durante 15 minutos, luego a una distancia de 7 cm de la base durante 10 minutos y por último a una distancia de 3 cm de la base por 5 minutos (vapores de nitrógeno líquido) y después fueron sumergidas en el nitrógeno líquido. Posteriormente, las pajillas fueron colocadas en las canastillas y almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido (-196°C), donde permanecieron por un periodo de 7 días.

3.7 Descongelación de pajillas

Después de 7 días, las pajillas fueron descongeladas para ser evaluadas. Primero, se retiró la pajilla del tanque de nitrógeno líquido; luego, se sumergieron en baño maría a 38°C durante 60 segundos. Las pajillas fueron secadas cuidadosamente y el contenido fue vertido en viales (0.5ml), los que se mantuvieron a 38°C. Se evaluaron las variables de motilidad, funcionalidad de la membrana, vitalidad y morfología, de manera similar para el semen fresco.

3.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para las variables de calidad espermática obtenidos de las colectas en alpacas y sometidas a los dos tratamientos físicos fueron organizados como base de datos en una hoja de cálculo de Excel Microsoft y posteriormente ingresaron al programa de análisis estadístico Stata 12.0 (StataCorp). Se organizaron y presentaron los valores estadísticos descriptivos de promedio y desviación estándar para los indicadores de calidad espermática de muestras de semen en fresco; se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los animales así como el número de colectas sobre cada uno de los indicadores de calidad. Posteriormente, se realizaron evaluaciones de los valores promedio de las variables de calidad espermática durante las fases de refrigeración y post-congelación, las cuales son organizadas y presentadas con valores estadísticos de promedio y desviación estándar. El efecto de los tratamientos sobre la evaluación de la calidad espermática durante las fases refrigeración y post-congelación fueron analizados mediante ANVA, para lo cual se realizarán análisis de residuos post-estimación mediante pruebas de normalidad de Kurtosis/asimetría (H_0 : Normalidad); al no distribuirse dichos residuos normalmente, se realizaron los análisis mediante la prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal Wallis. Todas las pruebas fueron analizadas bajo un nivel de significancia estadística de 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1 Evaluación de semen fresco

Los resultados descriptivos (promedio y desviación estándar) de las variables de calidad espermática en las muestras de semen en fresco son presentados en el cuadro 3. Éstos resultados no presentan el criterio utilizado para ser refrigerado (mayor de 35% de motilidad espermática). En relación a la motilidad espermática, los resultados indican gran variabilidad con respecto a las alpacas utilizadas, pues los valores promedio estuvieron en el rango de 14.17% a 66.43%. Se realizó un ANOVA para evaluar el efecto de los animales y el número de colectas (debido a que por cada animal se realizaron 6 a 7 colectas en intervalos de una semana) sobre los porcentajes de motilidad, demostrándose diferencias significativas entre animales ($p<0.05$) más no entre el número de colectas ($p>0.05$). De forma similar, la evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos y porcentajes de positivos al test de endosmosis (HOST) demostraron diferencias entre alpacas ($p<0.05$) más no entre el número de colectas ($p>0.05$) sobre los resultados. Por otro lado, los resultados del ANOVA para los valores promedio del porcentaje de espermatozoides normales no resultaron estadísticamente diferentes entre animales y en relación al número de colectas ($p>0.05$).

Cuadro 3. Características espermáticas de muestras de semen fresco obtenidas de cuatro alpacas machos adultas

| Número de alpaca | Motilidad espermática (%) | Espermatozoides vivos (%) | Espermatozoides positivos a HOST (%) | Espermatozoides normales (%) |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD |
| ID 001 (n=7) | 66.43 \pm 6.27 ^a | 77.57 \pm 8.06 ^a | 61.29 \pm 14.72 ^a | 76.43 \pm 4.96 ^a |
| ID 002 (n=6) | 52.50 \pm 20.68 ^a | 73.33 \pm 4.72 ^a | 38.00 \pm 14.56 ^a | 72.00 \pm 6.16 ^a |
| ID 003 (n=5) | 35.00 \pm 17.67 ^a | 66.40 \pm 7.64 ^a | 41.80 \pm 8.50 ^a | 70.80 \pm 4.15 ^a |
| ID 004 (n=6) | 14.17 \pm 7.36 ^b | 52.20 \pm 19.72 ^b | 25.20 \pm 4.32 ^b | 64.40 \pm 11.59 ^a |
| TOTAL | 43.33 \pm 24.30 | 68.52 \pm 14.07 | 43.13 \pm 17.59 | 71.43 \pm 7.89 |

ID: Identificación de alpaca

S. D: Desviación estándar

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

4.2 Evaluación de la calidad espermática en refrigeración

Los resultados de la evaluación de la calidad espermática son presentados en el cuadro 4. Sólo se refrigeraron los eyaculados que presentaron un promedio de 35% a más en porcentaje de motilidad en fresco. En relación al porcentaje de motilidad espermática, los resultados promedio para las muestras sometidas al tratamiento A (pasajes por aguja) fueron 46.11% \pm 9 (desviación estándar: 20.76), mientras que el porcentaje de motilidad promedio para las muestras sometidas al tratamiento B (agitación manual) fue 48.83% (desviación estándar: 22.91); siendo ambos resultados no significativos (K-Wallis test: 0.289; $p > 0.05$). En relación al porcentaje de espermatozoides vivos, los resultados promedio fueron casi similares entre los tratamientos A y B (61.47% y 62.87% respectivamente) y no demostraron ser estadísticamente diferentes (ANOVA $p > 0.05$). El porcentaje de positivos al test de endosmosis (HOST) en muestras de semen de refrigeración fue más alto para tratamiento B (40.80%; desviación estándar: 10.63%) comparado a tratamiento A (36.20%; desviación estándar: 11.5%) aunque no estadísticamente diferentes (ANOVA $p > 0.05$). En relación al porcentaje de

espermatozoides normales, los resultados promedio fueron ligeramente superiores para muestras sometidas al tratamiento B (73.40%; desviación estándar: 8.30). que en tratamiento A (71.33%, desviación estándar: 9.08%).

Cuadro 4. Características espermáticas en refrigeración de muestras de semen sometidas a dos tratamientos físicos

| Tratamientos experimentales | Motilidad espermática (%) | Espermatozoides vivos (%) | Espermatozoides positivos a HOST (%) | Espermatozoides normales (%) |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
| | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD |
| A (n=16) | 46.11 \pm 20.76 ^a | 61.47 \pm 14.24 ^a | 36.20 \pm 11.55 ^a | 71.33 \pm 9.08 ^a |
| B (n=16) | 48.83 \pm 22.91 ^a | 62.87 \pm 12.96 ^a | 40.80 \pm 10.64 ^a | 73.40 \pm 8.30 ^a |
| TOTAL | 47.47 \pm 20.59 | 62.17 \pm 13.40 | 38.50 \pm 11.16 | 72.37 \pm 8.61 |

A: Acción mecánica mediante pasaje con aguja 18; B: Agitación manual

S.D: Desviación estándar

^aSuperíndices iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

4.3 Evaluación de la calidad espermática post-congelación

Se congelaron los eyaculados que presentaron un promedio de 35% a más en porcentaje de motilidad en refrigerado. Los resultados de las variables de la calidad espermática fueron menores durante la fase post-congelación que la fase de refrigeración. Como indica el cuadro 5, el porcentaje promedio de motilidad espermática para las muestras sometidas al tratamiento A fue de 21.43% (desviación estándar: 17.16%) mientras que el promedio de muestras para el tratamiento B fueron 15.93% (desviación estándar: 13.98%); siendo ambos resultados no estadísticamente significativos (K-Wallis: 1.67; $p > 0.05$). En relación al porcentaje de espermatozoides vivos promedio, los resultados de evaluación post-congelación fueron superiores en muestras sometidas al tratamiento B (35.58%; desviación estándar: 21.94%) comparado a los resultados para las muestras sometidas al tratamiento A (32.42%; desviación estándar: 20.03%), pero no fueron estadísticamente diferentes (ANOVA, $p > 0.05$). El análisis para el porcentaje promedio de positivos a la prueba de endosmosis (HOST) indicó un valor más alto en muestras del

tratamiento B (25.45%; desviación estándar: 9.86%) que en muestras del tratamiento A (20.18%; desviación estándar: 8.48%), aunque los resultados no fueron estadísticamente diferentes (ANOVA, $p>0.05$).

Cuadro 5. Características espermáticas post congelación de muestras de semen sometidas a dos tratamientos físicos

| Tratamientos experimentales | Motilidad espermática (%) | Espermatozoides vivos (%) | Espermatozoides positivos a HOST (%) | Espermatozoides normales (%) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD | Promedio \pm SD |
| A (n=14) | 15.93 \pm 13.98 ^a | 32.42 \pm 20.03 ^a | 20.18 \pm 8.48 ^a | 63.90 \pm 14.18 ^a |
| B (n=14) | 21.43 \pm 17.16 ^a | 35.58 \pm 21.94 ^a | 25.45 \pm 9.86 ^a | 64.00 \pm 13.94 ^a |
| TOTAL | 18.68 \pm 15.61 | 34.00 \pm 20.61 | 22.82 \pm 9.37 | 63.95 \pm 13.68 |

A: Acción mecánica mediante pasaje con aguja 18; B: Agitación manual

S.D: Desviación estándar

^aSuperíndices iguales indican que no existe diferencia significativa ($p<0.05$)

V. DISCUSIÓN

Según los resultados, podemos darnos cuenta que existe una gran variabilidad en las muestras colectadas de semen fresco entre machos (Morton *et al.*, 2008), y, aunque no haya existido diferencias significativas en ninguna variable entre los eyaculados del mismo macho en tres de los cuatro machos utilizados en el experimento, no siempre se pudo obtener una muestra correcta en los días de colección, debido a la falta de líbido del animal o a la obtención de solo plasma seminal, desconociendo el factor que determina estas irregularidades en la colección.

Como se mencionó anteriormente, la viscosidad del semen influye para que la motilidad individual sea de tipo oscilatoria y muy lenta (Sumar, 1997). Esto puede explicar el porqué del aumento de motilidad entre el semen fresco y refrigerado, obteniéndose mayores porcentajes de motilidad en semen refrigerado por la ausencia de plasma seminal.

En llamas, Bérghamo *et al.* (2012) realizaron un experimento probando diferentes métodos de reducción de la filancia en el semen de llama: método mecánico (pasajes por aguja), diluciones con suero puro y diluciones con PBS, encontrándose que sólo el método mecánico disminuyó la filancia significativamente con respecto al control y los demás tratamientos.

Morton *et al.* (2008) realizaron experimentos para obtener el método más eficiente para reducir la viscosidad del semen. Utilizaron diferentes métodos como centrifugación (600 g por 7 minutos) y pasajes por aguja (26 – 30 gauge). Los resultados que encontraron fueron que la motilidad antes y después de la centrifugación se mantuvo, pero es difícil remover el sobrenadante porque jala parte del pellet formado y hay una gran pérdida de espermatozoides. En nuestro experimento, como se utilizó un método mecánico previo a la centrifugación, no tuvimos problemas con el pellet porque al momento de retirar el sobrenadante, el pellet seguía bien formado. Con respecto los pasajes por aguja, Morton *et al.*, (2008) encuentran que no son eficientes para reducir la viscosidad del semen y los parámetros del semen se alteran. En nuestro experimento, los pasajes por aguja redujeron la viscosidad y no alteraron los parámetros seminales.

Generalmente, la criopreservación con semen de camélidos ha ofrecido pobres resultados (Morton *et al.*, 2010). Las motilidades post-descongelación de semen fresco reportadas oscilan entre el 10% a 20 % (Santiani *et al.*, 2005) en alpacas o 30% (Bravo *et al.*, 1996). Casi nunca la motilidad post-descongelación de los camélidos a superado el 40% (Morton *et al.*, 2010). En el presente trabajo, se ha encontrado ocho muestras entre los tratamiento A y B que oscilan entre el 35 y 45 % de motilidad, las que son similares a los mejores resultados de trabajos anteriores. Si bien se han encontrado resultados muy bajos también, se sigue demostrando lo factible de utilizar métodos que reduzcan la viscosidad del semen en los camélidos sudamericanos para obtener mejores resultados.

Santiani *et al.*, (2005) utiliza pasajes por aguja para disminuir la viscosidad y halla porcentajes de motilidad post-descongelación de 20% utilizando un dilutor de leche descremada, yema de huevo y fructuosa con un crioprotector de etilenglicol. A pesar que no se reportó el efecto sobre la viscosidad del semen en motilidad y funcionalidad, tampoco se reporta ningún efecto perjudicial por haber utilizado pasajes por aguja.

En nuestro experimento, no hemos encontrado diferencias significativas comparando el tratamiento por pasajes por aguja y agitación manual, ni en refrigeración ni

post-descongelación aunque siempre ha existido una diferencia numérica a favor del tratamiento de agitación manual.

Existen diferentes trabajos que utilizan solo la centrifugación para separar el plasma seminal y hacer protocolos de criopreservación. Por ejemplo, El-Bahrawy (2010) centrifuga semen de dromedarios y encuentra que este procedimiento ayuda a superar las limitaciones en el congelamiento del semen. Además, Turín *et al.* (2013) trabaja con alpacas y encuentran que la calidad del semen descongelado no se deteriora cuando el semen fresco se le retira el plasma seminal mediante la centrifugación.

El presente trabajo es la primera experiencia reportada sobre el uso de estos dos tratamientos físicos y su evaluación en refrigeración y post descongelación.

VI. CONCLUSIONES

- No existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos físicos de pasajes por aguja y agitación manual en el tratamiento del semen fresco de alpaca sobre la calidad espermática post congelación.
- El uso de métodos físicos para el tratamiento del semen fresco de alpaca pueden ser parte de protocolos de criopreservación de semen de alpaca.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de las variables de calidad espermática inmediatamente después de haber hecho los métodos físicos en el tratamiento de semen fresco de alpaca.
- Realizar nuevos protocolos de centrifugación, disminuyendo el tiempo de ésta.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Jaswant S. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas y llamas. *Biol. Reprod.* 73: 452-457.
2. Adams GP, Ratto MH. 2001. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Rev. de investigaciones veterinarias del Perú* 1: 134-141.
3. Aisen E, Alvarez H, Venturio A, Garde J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
4. Alarcón B, García B, Bravo PW. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *RevInvVet Perú* 23(1): 58-64.
5. Andrade MA. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
6. Ashworth PJ, Harrison PA, Miller NG, Plummer JM, Watson PF. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of cultura media as compared with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 173-180.

7. Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT. 2006. Fundamentos de criopreservación. Revista colombiana de obstetricia y ginecología 57 (4): 291-300.
8. Ball BA, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. J Androl 22: 1061-1069.
9. Banda RJ. 2009. Evaluación de los dilutores en base a Tris, Tes y Leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
10. Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muíño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biol Reprod 63: 1531-1537.
11. Baumber, J.; Ball, B.; Linfor, J. y Meyers, S. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J Androl. 24: 621-628.
12. Bérghamo NS, Medina VH, Martínez CY, Vagnoni YC, Aisen EG. 2012. Efecto de diferentes métodos de reducción de la filancia en el semen de *Lama glama*. Conferencias, resúmenes y trabajos. VI Congreso mundial de camélidos sudamericanos. Arica, Chile.
13. Boiso I. 2001. Principios básicos de criobiología. Revista iberoamericana de fertilidad 18 (4).
14. Bravo PW, Alarcon R, Ordoñez V. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. ArchAndrology 48: 65-72.

15. Bravo PW, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. 2012. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 136: 157- 163.
16. Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. 13th ICAR Sydney, Australia.
17. Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. 1997. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. *Biology of reprod.* 57: 520-524.
18. Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997b. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
19. Bravo PW, Johnson LW. 1994. Reproductive physiology of the male camelid. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 10: 259-264.
20. Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 173-193.
21. Bravo PW. 1994. Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 10: 265-279.
22. Bravo PW. 1995. Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Proceedings of Post Graduate Foundation in Veterinary Science of University of Sydney* 257: 61-66.
23. Bravo PW. 2000. Male llama semen evaluation. En: *Camelid medicine, surgery and reproduction*. Ohio: The Ohio State University College of Veterinary Medicine.
24. Bravo WP. 2002. The reproductive process of South American camelids. Utah: Seagull Printing. 100p.

25. Brockbank MKG, Covault JC, Taylor JM. 2007. Cryopreservation guide. Thermo Scientific. p. 24
26. Brown BW. 2000. A review on reproduction in South American camelids. Anim. Reprod. Sci. 58: 169-195.
27. Buendia P, Soler C, Paolicchi F y otros. 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer (R) computer-assisted system. Theriogenology vol 57. p 1207-1218.
28. Bustinza V. 2001. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 343 p.
29. Chen BX, Yuen ZX, Pan GW. 1985. Semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J. Reprod. Fert. 74: 335-339.
30. Davalos R, Olazabal J. 2002. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. 13 (2): 98-99.
31. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Dass HG, Colenbrander G, Werkleij AJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. Cryobiology 30: 32-44.
32. Demianowicz W, Strezek J. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. Reprod Domest Anim 31: 279-280.
33. El-Bahrawy KA. 2010. Effect to seminal plasma centrifugation for viscosity elimination on cryopreservation of dromedary camel semen. Nature and science 8(9): 196-202.

34. Elwishy AB. 1988. Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review. Anim. Reprod. Sci. 17: 217-241.
35. England BG, Foote WC, Cardoza AG, Matthews DH, Riera S. 1971. Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). J. Endocrinol. 45: 505-513.
36. England G, Allen W. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. Effects of seminal plasma and blood. Theriogenology 37: 373-381.
37. Evans G, Maxwell WMC. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney.
38. Fernandez-Baca S, Calderon M. 1966. Métodos de colección de semen de la alpaca. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM 18:20.
39. Fernandez-Baca S, Sumar J, Novoa C. 1972. Comportamiento de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Rev. Inv. Pec. IVITA – UNMSM 1: 115-128.
40. Fernandez-Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. Anim. Reprod. Sci. 33: 307-323.
41. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Anim Reprod Sci 71: 13-23.
42. Fowler ME. 1998. Medicine and surgery of South American camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco. 2^a ed. Iowa: Blackwell publishing. 564 p.
43. Franco E, Sumar J, Varela M. 1981. Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas: Corporación Nacional Forestal, Instituto de la Patagonia, Chile.

44. Galindo W. 1995. Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nacional del Altiplano.
45. Galloway DB. 2000. The development of the testicles in alpaca in Australia. En: Proceedings of the Australian Alpaca Association Conference. Canberra.
46. García JV. 1984. Criopreservadores concepto y manejo. Biol Clin Hematol 6: 219.
47. Garner DL, Hafez ESE. 2002. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 98-112.
48. Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Anim. Reprod. Sci. 32: 85-90.
49. Garnica J, Flores E, Bravo PW. 1995. Citric acid and fructose concentrations in seminal plasma of the alpaca. Small Rumin. Res. 18: 95-98.
50. Gauly M, Leindinger H. 1996. Semen quality characteristics, volume distribution and hypo-osmotic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. En: 2nd European symposium on south american camelids. Universita Di Camerino. p. 235-244.
51. Giuliano S, Aguero A, Spirito S, Chaves G, Boquet M, Rutter B, Ferrari M. 2001. Heat stress effects on sperm morphology in *Lama glama* (Abstract). Biocell 24 (3): 265.
52. Giuliano SM, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim. Reprod. Sci. 104 (N° 2): 359-369.

53. Giuliano SM, Spirito SE, Maragaya MH. 2002. Electroejaculation and seminal parameters in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology* 57: 583.
54. Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67: 1811-1816.
55. Hafez ESE. 2002. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 441-452.
56. Huanca W, Adams GP. 2007. Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. En: Youngquist R, Threlfall W. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2º Edición: Saunders – Elsevier Inc. P. 869-873.
57. Huanca W, Gauly M. 2001. Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 1: 460-464.
58. Illera M. 1994. *Reproducción de los animales domésticos*. 1ª ed. España: Aedos.
59. Isachenko E, Isachenko V, Kathov II, Dessole S, Nawroth F. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 6: 191 – 200.
60. Jeyendran R, Van Der H, Perez-Pelaes M, Crabo B, Zaneveld L. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219 – 228.
61. Johnson LW. 1989. Llama reproduction. *Vet. Clin. N. Am. FoodAnim. Pract.* 5: 159-182.

62. Kumar S, Millar J, Watson P. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46: 246-253.
63. Lamia A, Daniel T, Laëtitia J, Chantal T, Olivier G, Jean LC, Marc A. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl 1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61: 895-907.
64. Lichtenwalner AB., Woods GL, Weber JA. 1996. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46:293-305.
65. Lovelock JE. 1953. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10: 414-426.
66. Mazur P. 1984. Freezing and living cells: mechanism and implications. *Am J Physiol – Cell Physiol* 247: 125-142.
67. McEvoy TG, Bourke DA, Adam CL. 1994. Recent advances in understanding and controlling the reproductive biology of South American camelids. En: *Reproductive technology and andrology meeting*. España 5: 277-298.
68. Medeiros CM, Forel F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
69. Mogrovejo D. 1952. Estudios del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 21 p.
70. Montalvo C, Cevallos E, Copaira M. 1979. Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. *Res Proyectos de Investigación*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: 37.

71. Morton KM, Thomson PC, Bailey K, Evans G, Maxwell WMC. 2006. Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reprod. Dom. Anim.* 45(4): 637-643.
72. Morton KM, Vaughan JL, Maxwell WMC. 2008. Continued development of artificial insemination technology in alpacas. RIRDC Publication 08/057.
73. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
74. Novoa C, Leyva V. 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica IVITA- UNMSM 26: 32.
75. Novoa C, Sumar J, Franco E. 1970. Empadre complementario de alpacas hembras vacías (Abstract). En: Proc. 1st. Int. Conv. On South American camelids. Puno: Univ. Nac. Técnica del Altiplano.
76. Novoa C. 1970. Reproduction in camelidae. *J. Reprod. Fertil.* 22: 3-20.
77. Nowshari MA, Brem G. 2001. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. *Human Reproduction* 16: 2368-2373.
78. Nuñez ME, Genovese P, Cordero A, Picabea N, Cárdenas O., Huanca W. 2007. Desarrollo heterogéneo, alternante y altamente ordenado en los túbulos seminíferos de la alpaca adulta (*Vicugna pacos*): resultados preliminares. ALPA. Cuzco, Perú.
79. Pacheco J. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET IX* (4): 1-17.

80. Pan G, Chen Z, Liu X. 2001. Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* 55: 1863-1879.
81. Pan G, Xie Q, Cai X. 2003. Study on ovulation inducing mechanism in Bactrian camel II target organ ovulation inducing factor (OIF) and its metabolic dynamics in Bactrian camel. *Sci. Agr.* 36: 105-110.
82. Pan GW, Zhao XX, Chen BH . 1992. The ovulation-inducing effect of seminal plasma in the Bactrian camel. En: First International Camel Conference. Newmarket: R&W Publications.
83. Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos-Obregon E. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 203-210.
84. Parrilla I, Vásquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, Martínez EA. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 128: 615-621.
85. Porcu E. 2001. Oocyte cryopreservation. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of assisted reproductive techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*, London, UK. Martin Dunitz Ltd.
86. Rasul Z, Ahmed N, Anzar M. 2007. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology* 68: 813-819.
87. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2005. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: 29-39.

88. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2006. Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas and bulls. *Theriogenology* 66: 1102-1106.
89. Raymundo F, Huanca W, Huertas S, Gauly M. 2000. Influence of different extender on the motility in alpaca (*Lama pacos*) semen. En: 2nd Int camelid conference agro economics of camel farming Almaty. Kazakhstan.
90. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. 2004. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology* 61: 1009-1024.
91. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1848-1858.
92. Ruíz GL. 2005. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
93. Salamon S, Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
94. San Martín, F. 1961. Fisiología de la reproducción de la alpaca. En: An. Symp. sobre problemas ganaderos. Lima.
95. Sandoval MR. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeables y no permeables. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
96. Santiani A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Ternuco: Facultad de Medicina – Universidad de la Frontera.

97. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian J Androl 7(3): 303-309.
98. Smith CL, Peter AT, Pugh DG. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: a review. Theriogenology 41: 573-592.
99. Solis R. Producción de camélidos sudamericanos: Estudio zootécnico de la alpaca. Imprenta Ríos. Huancayo. p. 253-255.
100. Sumar J, Leyva C. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). En: Memorias de la IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas.
101. Sumar J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 115 p.
102. Sumar J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago: Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
103. Sumar J. 1994. Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. J. Arid. Environments 26: 39-45.
104. Sumar J. 1996. Reproduction in llamas y alpacas. Anim. Reprod. Sci. 42: 405-415.
105. Sumar J. 1997. Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Avances en reproducción de rumiantes. I Symposium Internacional. APPA-Perú: 45-56.

106. Sumar J. 2002. Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: McGraw Hill Interamericana. p 224-242.
107. Sutowisky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: J. De Jonge C., Barratt L. R. C., eds. The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration. Estados Unidos. Cambridge University Press. p. 1-30.
108. Tibary A, Memon MA. 1999. Reproduction in the male South American Camelidae. J. CamelPrac. Res. 6: 235-248.
109. Tibary A, Vaughan J. 2006. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. Small Rumin. Res. 61: 283-298.
110. Tibary A. y Anouassi A. 1997. Theriogenology in camelidae. Actes Editions, Rabat, Morocco.
111. Tselkas, K., Saratsis, P., Karagianidis, A. y Samoulidis, S. 2000. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed semen and their effects on some semen parameters. Dtsch Tierarztl Wochenschr 107: 69-72.
112. Turín J, Madrid N, Aranguren JA, Limache T, Huanca W. 2013. Efecto de la remoción del plasma seminal y centrifugación sobre la calidad de los espermatozoides descongelados de alpacas (*Lama pacos*). Memorias de la XXXVI Reunión científica anual de la Asociación Peruana de Producción Animal.
113. Valdivia M, Ruiz M, Bermudez L y otros. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. Paper presentado al Proc of the 2nd Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú.

114. Velasquez CV, Novoa MC. 1999. Superovulación con PMSG aplicada fase folicular y fase luteal en alpacas. Rev. Int. Vet. Peru 10: 1-8.
115. Vilela W. Primer curso internacional de manejo y biotecnología de camélidos sudamericanos. Anatomía y fisiología de los CSA.
116. Von Baer L, Hellemann C. 1999. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen. Reprod. Domest. Anim. 34: 95-96.
117. Von Kubineck J. 1974. Samenentnahme beim Alpaka durch eine Harnohrenfistel. Z. Tierzucht 90: 335.
118. Wang, A., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. y Loughlin, K. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology 49: 921-925.
119. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Repro Sci 111: 69-79.
120. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 60: 481-492.
121. Way AL, Griel Jr LC, Killian GJ. Effect of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. 2000. J Androl 21: 213-219.
122. Xu YS, Wang HY, Zeng GQ, Jiang GT, Gao YH. 1985. Hormone concentrations before and after semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus Bactrianus*). J. Reprod. Fertil. 74: 341-346.
123. Zhao XX, Huang YM, Chen BX. 1992. Studies on the semen characteristics of Bactrian camel semen. Chin. J. Anim. Sci. 28: 13-15.

IX. APÉNDICES

APÉNDICE 1. Preparación de Triladyl® según manual de Minitub 13500/0250

Para la preparación del diluyente se requiere:

- Triladyl® concentrado
- Agua pura estéril
- Yema de huevo fresca
- Probeta graduada estéril o matraz de Erlenmeyer
- Papel filtro estéril
- Filtro-embudos estériles

El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua pura esteril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final.

La solución madre se prepara vertiendo primero un frasco completo de concentrado de Triladyl® (250 g) en un matraz graduado, y agregando en varios pasos 750 ml de agua pura estéril. Esta solución madre es estable y puede mantenerse a + 5°C por alrededor de una semana.

Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 250 ml de yema de huevo fresca. Es posible pesar 250 g de yema de huevo, por cuánto el volumen y peso son equivalentes. Se puede esterilizar la cáscara del huevo pasándolo por una llama. En seguida se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara, vertiendo la yema,

sin romperla, de una a otra mirad de la cáscara. Para liberar completamente la yema de la clara y las membranas, se colocan una por una sobre papel filtro, haciéndolas rodar sobre el papel, que retiene los restos. Finalmente, la yema de huevo se posiciona en el borde del papel filtro, se envuelve en el papel y se presionar para abrir la membrana de tal forma, que la yema escurra libremente, dejando adherida la membrana al papel. Enseguida, se le agrega a la yema lentamente la solución madre, mezclándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio estéril. La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl® (agregar la solución madre a la yema, no al revés).

Para terminar, el diluyente preparado debe filtrarse a través de un filtro-embudo estéril o una gasa estéril, con lo que queda listo para su utilización.